

Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend

Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

ZUM VERHALTEN DER GLYCOLIPOIDE DER WEISSEN
HIRNSUBSTANZ WÄHREND DER AUTOLYSE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Carola Leube
aus Friedrichroda

1969

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e. V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin

im Städtischen Krankenhaus Westend

Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

ZUM VERHALTEN DER GLYCOLIPOIDE DER WEISSEN
HIRNSUBSTANZ WÄHREND DER AUTOLYSE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Carola Leube

aus Friedrichroda

Dekan: Professor Dr. med. Hans Heinz Naumann
Referent: Priv. Doz. Dr. med. Friedrich Lindlar
Korreferent: Professor Dr. med. J. Cervós-Navarro

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 19. April 1969



Inhalt:

	Seite
I. Einleitung und eigene Zielsetzung	5
II. Material und Methoden	8
1. Material	8
2. Extraktion der Gesamtlipide	8
3. Bestimmung der Cerebroside	9
4. Dünnschichtchromatographie	10
5. Säulenchromatographische Darstellung eines Cerebrosidpräparates als Testsubstanz	11
6. Fehlerberechnung	12
III. Ergebnisse	14
1. der Extraktion der autolysierten Gewebsproben	14
2. der Vorversuche zur Bestimmung des lipoidgebundenen Zuckers	14
3. der säulenchromatographischen Darstellung des Cerebrosidpräparates	19
4. der Untersuchung der Autolyseserie	22
IV. Diskussion	26
V. Zusammenfassung	30
VI. Literatur	31

Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung und eigene Zielsetzung

In jüngerer Zeit gewinnt die Abgrenzung der intravitalen von den postmortalen Veränderungen gerade am Gehirn im Hinblick auf die mit der Reanimation nach klinischem Tod zusammenhängenden Probleme besondere Bedeutung.

SCHNEIDER u. Mitarb. (1967) konnten zeigen, daß nach mehrtägiger Reanimation Befunde am Gehirn erhoben werden können, die morphologisch einer "intravitalen Autolyse" gleichen. Die Kenntnis der chemischen Veränderungen der an der Bildung der Hirnstruktur beteiligten Lipide während der Autolyse in vitro und während des Lebens bzw. während intravitaler pathologischer Vorgänge dürfte die Einordnung dieser Befunde entweder unter ein intravitales oder ein postmortales Geschehen ermöglichen helfen und damit zur Deutung pathogenetischer Zusammenhänge beitragen.

Pathologische Veränderungen am Gehirn werden in erster Linie an autopsischem Gewebsgut untersucht. Unter den Veränderungen beanspruchen demyelinisierende Prozesse, mehr noch Encephalomalacien allein schon wegen ihrer Häufigkeit ein besonderes Interesse. Die beim Zerfall der Markscheidensubstanz auftretenden Ab- und Umbauprodukte aus den myelinbildenden Lipoiden lassen sich teilweise morphologisch darstellen. So können beispielsweise die sauren Gruppen der freigesetzten Fettsäuren, die tropfigen Neutrallipide oder das freie bzw. im Rahmen der Umbauvorgänge veresterte Cholesterin in den Fettkörnchenzellen der anämischen Nekrose histologisch sichtbar gemacht werden. Naturgemäß lassen sich durch solche Methoden die Lipidgruppen nur grob, bestimmten physikochemischen Eigenschaften entsprechend, charakterisieren. Die molekularen Veränderungen an den einzelnen Lipiden können in voller Breite nicht mit den Mitteln der Histochemie, sondern letztlich nur mit Hilfe der chemischen Analyse erfaßt werden.

In der Grundlagenforschung wie auch in der Diagnostik werden die die Chemie der Hirnlipide betreffenden Probleme in zunehmendem Maße durch Untersuchungen an autoptischem bzw. bioptischem Gewebsgut erforscht. Dem Untersuchenden stellt sich dabei immer wieder die entscheidende Frage, inwieweit vorgefundene Veränderungen auf intravitalen Vorgänge zurückgeführt werden dürfen. Insbesondere muß ausgeschlossen werden können, daß die Veränderungen durch postmortale Autolyse, die nach der Entnahme von Gewebe aus dem lebenden Organismus eingetreten ist, bedingt sind. Die genaue Kenntnis der durch Autolyse auftretenden Um- und Abbauvorgänge ist deshalb eine wesentliche Voraussetzung für die Beurteilung eines an autoptischem oder bioptischem Material gewonnenen Befundes. Durch systematische Untersuchungen an Serien autolysierender Organe *in vitro* und durch Analyse der zur Diskussion stehenden Substanzklassen können die bisher gewonnenen Erkenntnisse erweitert werden.

Die Ab- und Umbauvorgänge der Lipide des Gehirns während der Autolyse sind bisher nur teilweise erforscht. So fanden übereinstimmend SIMON (1911), SPERRY (1947) und BRANTE (1949) eine Abnahme der Phosphatide nach mehrstündigem Aufbewahren von Gehirnsubstanz außerhalb des Organismus. Die systematische Untersuchung der Phosphatide während einer Autolysezeit von 24 Tagen durch LINDLAR u. GÜTTLER (1966) zeigte eine verstärkte Abnahme des Lipoidphosphors vom 9. Tag der Autolyse an, beruhend auf der Spaltung von Lecithin und Plasmalogen. Die Abnahme dieser Lipide wird von einer entsprechenden Zunahme der freien Fettsäuren begleitet. Das Cholesterin bleibt bei 24-tägiger Autolyse unverändert (SPERRY u. Mitarb., 1942, LINDLAR u. GÜTTLER, 1966). Über das Verhalten der Glycolipide im autolysierenden Gehirn sind wenig exakte Angaben vorhanden. Man weiß zwar seit langem um die strukturelle Bedeutung der Glycolipide für den Aufbau des Nervengewebes; ihre Sonderstellung in bezug auf die mit

Entmarkung einhergehenden Erkrankungen ist aber erst in jüngerer Zeit erkannt worden. Gemeint sind die Leukodystrophien, ferner die von ROSSITER (1955) bei der Wallerschen Degeneration gefundene (gegenüber den Phosphatiden) verzögerte Spaltung der Sphingolipoide.

Autolysebedingte Veränderungen an den Glycolipoiden des Gehirns wurden offenbar erstmalig von NOLL (1899) untersucht. Dieser Autor fand einen unveränderten Anteil reduzierender Substanzen in der Protagonfraktion eines über 3 Tage autolysierenden Gehirnes. Wenn auch die auf Fällungstechniken beruhende Gewinnung der Protagonfraktion und der darin bestimmte Anteil an reduzierenden Substanzen nur sehr grobe Anhaltspunkte für das Verhalten der Cerebroside liefert, so deckt sich das Ergebnis doch mit dem von FAWAZ u. Mitarb. (1937) und BRANTE (1949). Diese Autoren fanden mit verbesserten Trennungsvorfahren ebenfalls keine mengenmäßige Veränderung der reduzierenden Zucker (und damit der Glycolipoide) während 4-stündiger bzw. 15-stündiger Autolyse. Auf Grund dünnschichtchromatographischer Darstellung der Gesamtlipidextrakte einer Autolyseserie konnten LINDLAR u. GÜTTLER (1966) vermuten, daß die Cerebroside auch bei Autolyse von 24-tägiger Dauer unverändert bleiben. Die Bestätigung dieses Befundes durch exakte quantitative Bestimmung der Cerebroside steht jedoch noch aus. Die vorliegende Untersuchung diente dem Ziel, quantitative Veränderungen der Cerebroside während der Autolyse festzustellen. Insbesondere war herauszufinden, ob während der Autolyse eine Abspaltung der im Cerebrosidmolekül glycosidisch gebundenen Hexose erfolgt. Verbunden damit war die Suche nach Spaltprodukten der Cerebroside wie z. B. nach Ceramid, das aus Sphingosin und säureamidartig gebundener Fettsäure besteht und als Restmolekül nach Abspaltung der Galactose verbleibt.

II. Material und Methoden

1. Material

Gehirn eines 77 Jahre alten Mannes.

Grundleiden: Kombiniertes Mitralvitium; Todesursache: Herzinsuffizienz. Hirngewicht: 1200 g. Makroskopischer Gehirnbefund: Geringer Hydrocephalus in- und externus, blasse graue Substanz.

Zwei Stunden nach dem Tode wurden aus dem Marklager beider Großhirnhemisphären 4-5 g schwere Gewebeproben entnommen, in tarierte 100ml-Erlenmeyer-Kolben gegeben und gewogen (Frischgewicht). Die erste Probe (2 Std. post mortem) wurde sofort weiterverarbeitet; die übrigen Proben wurden in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur über eine Zeitdauer von maximal 24 Tagen der sterilen Autolyse überlassen. Auf die Einhaltung steriler Versuchsbedingungen wurde geachtet. Jeweils nach den im Versuchsprogramm festgelegten Intervallen wurden Proben entnommen und bei diesen nach mechanischer Zerkleinerung die Autolyse durch Lipidextraktion unterbrochen.

2. Extraktion der Gesamtlipide

Nach der von FOLCH u. Mitarb. (1957) angegebenen Methode wurden die Gesamtlipide durch Zugabe des 20fachen Volumens Chloroform-Methanol (2:1 V. T.) extrahiert, der Extrakt durch Filtration vom Rückstand getrennt und das Filtrat unter Zugabe von 0,1%iger wässriger Natrium-Chlorid-Lösung (ein Fünftel des Filtratvolumens) ausgeschüttelt. Nach Trennung der beiden Phasen wurde die untere (lipidhaltige) Phase in einen 100-ml-Meßkolben gegeben und mit Chloroform-Methanol (2:1 V.T.) auf 100ml aufgefüllt. Die Menge der Gesamtlipide wurde gravimetrisch nach Eindampfen aliquoter Mengen (bis zur Gewichtskonstanz) bestimmt. Die obere wässrige Phase enthält neben niedermolekularen Extraktionsstoffen die Ganglioside einschl. des von FOLCH u. Mitarb.

(1951) beschriebenen Strandin (eines uneinheitlichen, lediglich durch bestimmtes physikochemisches Verhalten gekennzeichneten Gangliosidpräparates). Diese wäßrige Phase wurde ebenso wie die extrahierten Organrückstände nach dem Eindampfen bzw. nach dem Trocknen gewogen und verworfen. Die Trockensubstanz errechnet sich aus der Addition der Werte für extrahierte Organrückstände, wasserlösliche Extraktstoffe und Gesamtlipide.

3. Bestimmung der Cerebroside

Zur Bestimmung der Cerebroside wurde die colorimetrische Methode nach BRÜCKNER (1941) in der Modifikation von SVENNERHOLM (1956) verwendet. Ein aliquoter Teil des Gesamtlipidextraktes wurde eingedampft und unter Erwärmen in Äthanol (1ml auf 1 mg Cerebrosid) gelöst. Die hydrolytische Spaltung der glycosidischen Bindung wurde durch Zugabe von 4 ml 3n- Schwefelsäure pro mg Cerebrosid in verschlossenen Reagenzgläsern und 2-stündigem Erhitzen im siedenden Wasserbad erreicht. Die Vollständigkeit der Hydrolyse wurde durch Dünnschichtchromatographie der chloroformlöslichen Anteile des Hydrolysates überprüft. Nach Abkühlen wurden die Proben mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Zur Beseitigung der bei der Hydrolyse ebenfalls abgespaltenen höheren Fettsäuren und der anderen lipophilen Spaltprodukte wurden die Proben mit jeweils 5 ml wassergesättigtem Chloroform geschüttelt (BRÜCKNER, 1941). Die von SVENNERHOLM (1956) angegebene Filtration wurde, dem Vorschlag von BRÜCKNER (1941) folgend, nicht angewendet, da - wie sich zeigte - trotz Vorwaschens der Filter mit 3n- Schwefelsäure das Filtrat eine stärkere Absorption in der anschließenden Farbreaktion aufwies, als die nicht filtrierten Proben. Nach Trennung der beiden Phasen wurden 2 ml des klaren Hydrolysates (Oberphase) nach 15-minütiger Kühlung im Eisbad mit 4,0 ml einer 0,2%igen Orzinsäurelösung versetzt, welche jedesmal frisch

aus Orzin und konzentrierter Schwefelsäure hergestellt wurde. Nach weiteren 15 Minuten wurden die Proben gut gemischt und zur Farbewicklung in ein Wasserbad von 80°C eingestellt. Nach genau 20 Min. wurde die Reaktion durch Abkühlen im Eisbad unterbrochen. Die in einem bestimmten Bereich der Zuckerkonzentration proportionale Intensität des gebildeten roten Farbstoffes wurde durch Messung der Extinktion im Spektrophotometer (Zeiss - Spektralphotometer PMQ II) bei der Wellenlänge $505\text{ m}\mu$ an Hand einer Eichkurve festgestellt. Zur Bestimmung der Eichkurve diente eine Verdünnungsreihe von 0,1%iger Galactoselösung. Entsprechend der Konzentration an 3n- Schwefelsäure in den hydrolysierten Gesamtlipidproben wurde auch bei den Proben zur Ermittlung der Eichkurve neben destilliertem Wasser 3n- Schwefelsäure zur Verdünnung verwendet. Der Leerwert enthielt an Stelle der Galactose mit Chloroform geschütteltes destilliertes Wasser. Die Eichkurve wurde vor jeder Bestimmung neu angefertigt. Die Cerebrosidmenge erhält man durch Multiplikation der ermittelten Galactosekonzentration mit dem Faktor 4,6 entsprechend dem mittleren Anteil der Galactose in den Cerebrosiden.

4. Dünnschichtchromatographie

Zur qualitativen Feststellung der Cerebroside, des Cholesterin, der freien Fettsäuren, des Ceramid und anderer Lipoide diente die Dünnschichtchromatographie. Es wurden $20 \times 20\text{ cm}$ große Glasplatten mit Kieselgel "G" nach Stahl (Fa. Merck) als Trägersubstanz $0,3\text{ mm}$ dick beschichtet. Die Trennung erfolgte in geschlossenen Kammern bei ca. 20°C . Fließmittel und Sprühreagenz wurden dem gewünschten Trenneffekt angepaßt.

Zur Abtrennung der Cerebroside diente Chloroform / Methanol/Wasser 72:28:4,5 V. T. Kammersättigung (JATZKEWITZ u. MEHL, 1960) Sprühreagenz Äthanol / Anisaldehyd / Schwefelsäure 50:1:1 V. T. Er-

wärmung auf 110°C (KÄGI u. MIESCHER; zit. RANDEATH, 1962). Zur Abtrennung des Cholesterin, der Cholesterinester und der freien Fettsäuren diente Petroläther / Diäthyläther / Essigsäure 87:13:1 V. T. Kammersättigung (MANGOLD u. TUNA, 1961). Sprühreagenz 5%ige Phosphormolybdänsäure. Erhitzen auf 100°C (KAUFMANN, 1961). Zur Abtrennung des Ceramid diente Chloroform / Eisessig 96:4 V. T. Sprühreagenz Bromthymolblau (JATZKEWITZ u. MEHL, 1960). Die jeweiligen Fraktionen wurden mit Hilfe authentischer Substanzen identifiziert.

5. Säulenchromatographische Darstellung eines Cerebrosidpräparates als Testsubstanz

Ausgehend von ca. 10 g menschlicher weißer Gehirnschubstanz wurden zunächst die Gesamtlipide nach dem Verfahren von FOLCH extrahiert. Im säulenchromatographischen Verfahren nach KISHIMOTO u. RADIN (1959) wurden dann die Cerebroside abgetrennt (Säulenlänge 70 cm, Durchmesser 2,5 cm). Als Adsorptionsmittel diente Florisil (Magnesiumtrisilikat), das nach einstündigem Erhitzen bei 600°C durch Zugabe von 7 ml Wasser pro 100 g Florisil und 12stündigem Äquilibrieren desaktiviert worden war. 45 g des desaktivierten Adsorptionsmittels wurden mit etwas Äther in die Säule eingeschwenmt. 1,5 g der im Rotationsverdampfer eingeeengten Gesamtlipide wurden in 60 ml Diäthyläther gelöst, mit weiteren 15 g Florisil verrührt und quantitativ auf die Säule gebracht. Es wurden zunächst mit 450 ml Diäthyläther die Neutralfette, das Cholesterin, die Phosphatide und die freien Fettsäuren eluiert. Die auf der Säule verbleibenden Cerebroside und Sulfatide wurden dann durch Auswaschen mit 1400 ml Chloroform-Methanol 4:1 V. T. gewonnen und in 10 ml Fraktionen aufgefangen. Die Reinheit wurde dünnsehichtchromatographisch und durch Bestimmung des Gehaltes an Galactose überprüft.

6. Fehlerberechnung

Zur Abschätzung der Fehlergrenzen der Methode zur quantitativen Bestimmung der Cerebroside wurde der Standardfehler berechnet, gemäß der Formel (MITTENECKER, 1966)

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum x^2}{N} - \mu^2}$$

Es bedeuten: x = Meßwert
 μ = Mittelwert
 N = Anzahl der Messungen
 σ = Standardabweichung

Die Formel entspricht der üblichen Formel zur Bestimmung der Standardabweichung

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum x^2}{N}}$$

x = Abweichung vom Mittelwert
 N = Anzahl der Messungen

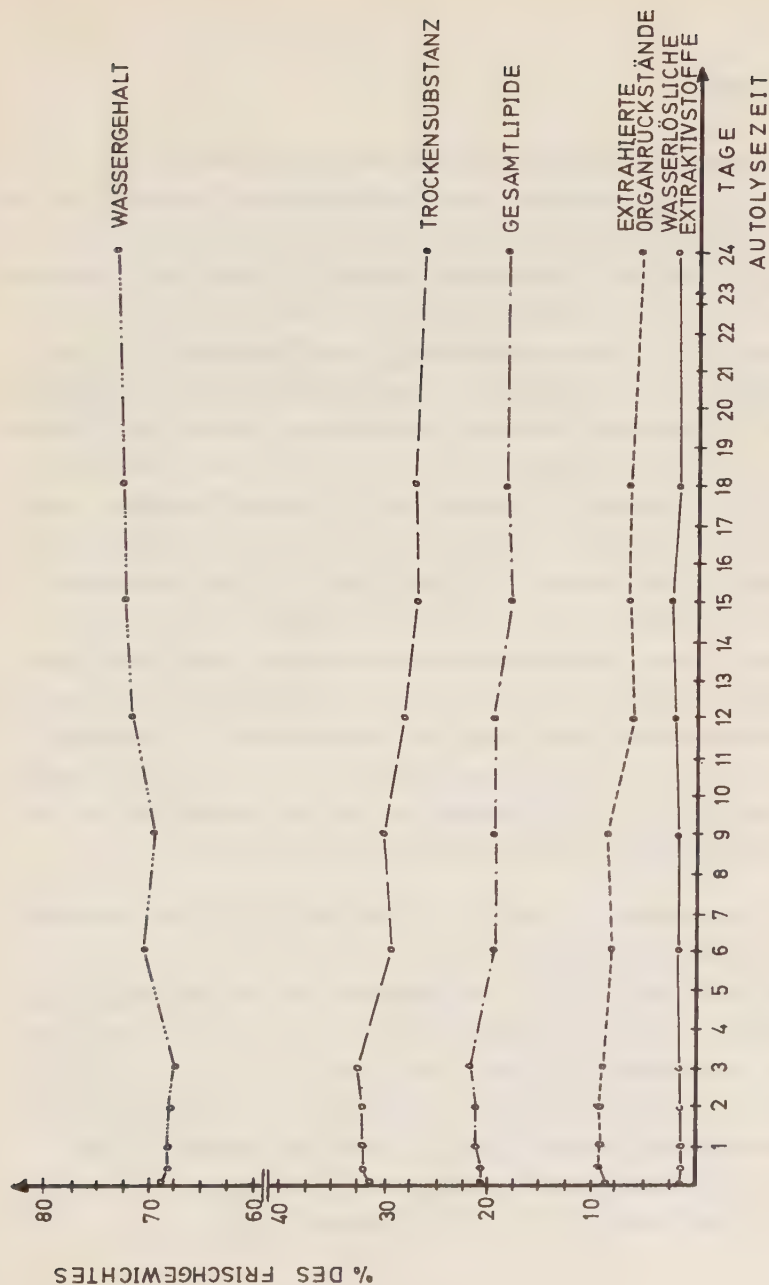


Abb. 1 Relative Zusammensetzung des Frischgewichtes.

III. Ergebnisse

1. Ergebnis der Extraktion der autolysierten Gewebeproben

In Abb. 1 ist die prozentuale Zusammensetzung des Frischgewichtes in Abhängigkeit von der Autolysedauer graphisch dargestellt. Es ist ersichtlich, daß mit fortschreitender Autolyse der Anteil der Trockensubstanz abnimmt bei entsprechender Zunahme des Wassergehaltes. Die Abnahme der Trockensubstanz ist durch eine Verminderung der Gesamtlipide und der extrahierten Organrückstände bedingt. Die ebenfalls zur Trockensubstanz zählenden wasserlöslichen Extraktivstoffe nehmen zu. Bezieht man die genannten Fraktionen statt auf das Frischgewicht auf das Trockengewicht, so finden sich eine geringe prozentuale Zunahme der Gesamtlipide von 66,6 auf 69,8 %, eine stärkere Zunahme der wasserlöslichen Extraktivstoffe von 4,8 auf 8,1 %. Die extrahierten Organrückstände zeigen eine deutliche Abnahme von 28,6 auf 22,0 %. Die Zunahme der wasserlöslichen Extraktivstoffe läßt sich durch eine Spaltung sowohl der organischen Bestandteile der Hirnsubstanz wie auch der Gesamtlipide in niedermolekulare wasserlösliche Spaltprodukte erklären. Die Zunahme der Gesamtlipide bezogen auf die Trockensubstanz ist nur relativ und erklärt sich daraus, daß die Gesamtlipide nicht in gleichem Maße wie die gesamte Trockensubstanz abnehmen.

2. Ergebnisse der Vorversuche zur Bestimmung des lipoidgebundenen Zuckers

Zur Ermittlung optimaler Versuchsbedingungen bei Anwendung der oben genannten Methode zur Bestimmung des lipoidgebundenen Zuckers und damit der Cerebroside wurden zunächst einige Vorversuche angestellt. Da die Zuckerkomponente der weißen Hirnsubstanz des Menschen ausschließlich aus Galactose besteht (KLENK, 1926; BRANTE, 1949; CHARGAFF, 1955; RADIN, 1955), konnte als Vergleichs- und Eichlösung reine Galactose (Fa. Merck) verwendet werden.

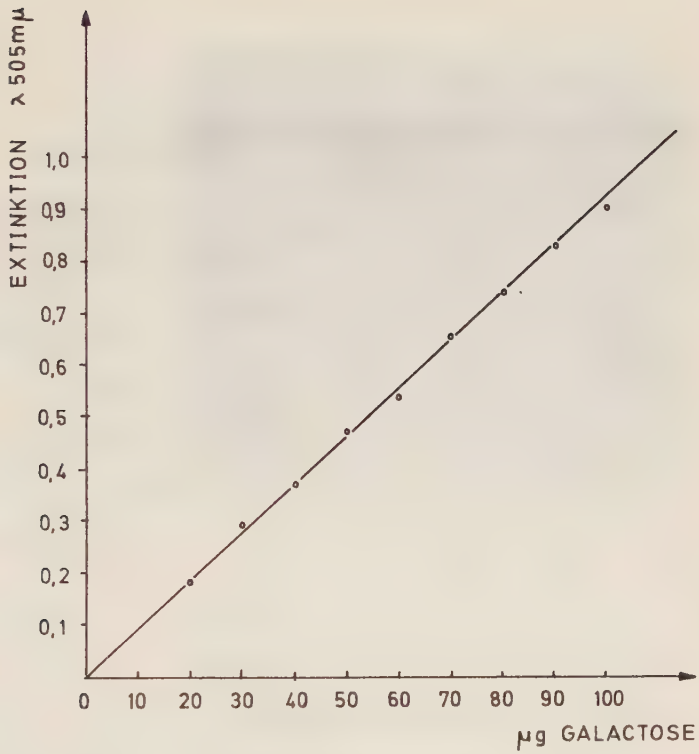


Abb. 2 Eichkurve zur photometrischen Bestimmung der Galactosekonzentration .

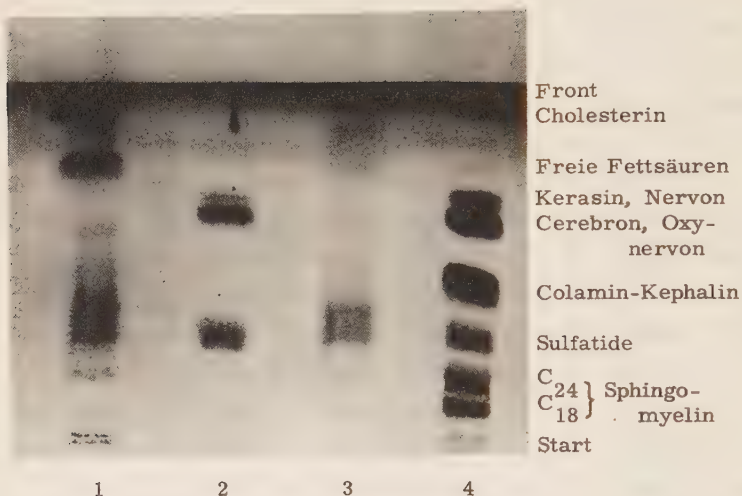


Abb. 3 Dünnschichtchromatogramm des Chloroform-
auszugs aus hydrolysierten Gesamtlipiden
und Cerebrosiden.

1 hydrolysierte Gesamtlipide; 2 Cerebro-
side und Sulfatide (Testsubstanz); 3 hy-
drolysierte Cerebroside und Sulfatide;
4 Gesamtlipide. Auftragemenge 0,5 mg.
Fließgemisch Chloroform/Methanol/Wasser
72:28:4, 5 V. T. Darstellung mit Äthanol/
Anisaldehyd/Schwefelsäure.

Um den optimalen Wellenbereich zur Messung der Absorption festzustellen, wurde die Extinktion des aus einer bestimmten Galactosemenge, Orzin und konzentrierter Schwefelsäure gebildeten Farbstoffes in Abhängigkeit von der Wellenlänge im Bereich zwischen 395 und 555 m μ gemessen. In Übereinstimmung mit den Angaben von SVENNERHOLM (1956) zeigten sich Absorptionsmaxima bei 425 und 505 m μ . Die von diesem Autor empfohlene Wellenlänge von 505 m μ wurde hinfort in allen weiteren Messungen beibehalten.

Der Bereich der Galactosekonzentrationen, für den das LAMBERT-BEERSche Gesetz ($E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot C \cdot d$; E = Extinktion; ϵ_{λ} = molarer Extinktions-Koeffizient; C = Konzentration in Mol/l; d = Schichtdicke (LANGE, 1952) erfüllt ist, wurde an Hand einer Verdünnungsreihe von Galactose bestimmt. Es zeigte sich proportionales Verhalten von Konzentration und Extinktion im Bereich zwischen 10 und 150 μ g Galactose. Abb. 2 gibt die Eichkurve für Galactosekonzentrationen von 20 bis 100 μ g wieder.

Schließlich wurde untersucht, inwieweit die in bezug auf reine Galactose überprüfte Methode auf die Bestimmung der Cerebroside anwendbar ist. In einem Handelspräparat von reinen, chromatographisch einheitlichen Cerebrosiden (Fa. Applied Science Laboratories, USA) ergab sich bei Anwendung der obengenannten Methode ein mittlerer Galactosegehalt von 21,9 % (4 Bestimmungen 21,6; 22,0; 21,6; 22,4 %).

Dieser stimmt mit dem theoretischen Wert von 21,8 - 22,2 % (ZÖLLNER u. EBERHAGEN, 1965) gut überein.

Zur weiteren Kontrolle der Methode wurde ein Gesamtlipidextrakt aus menschlicher weißer Hirnsubstanz gewonnen und darin ein an Hand der Galactosebestimmung errechneter Cerebrosidanteil von 24,9 % (4 Doppelbestimmungen 23,6; 24,9; 26,6; 24,6 %) ermittelt.

Ein Gemisch aus 3,5 mg Gesamtlipiden und 1 mg Cerebrosiden ergab bei Bestimmung der abgespaltenen Galactose eine Cerebrosidmenge,

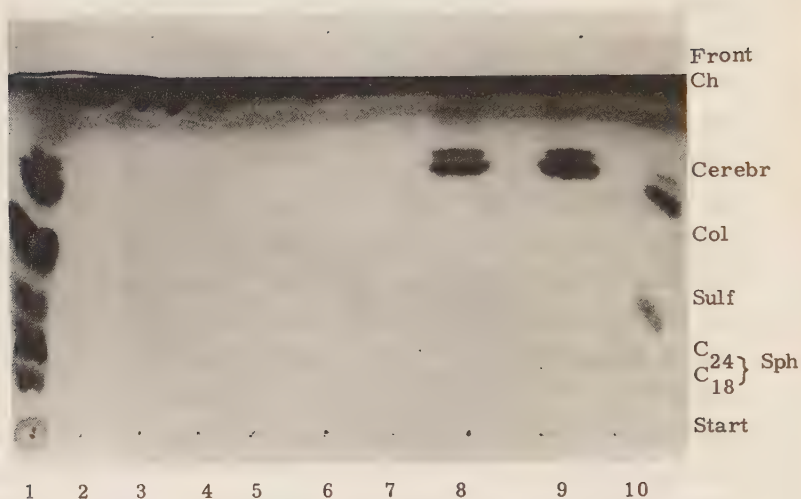


Abb. 4 Dünnschichtchromatogramm der säulenchromatographisch mit Florisil gewonnenen Fraktionen.

Auftragstellung 1 Gesamtlipide (Kontrolle); 2-7 mit Diäthyläther eluierte Fraktionen; 8-10 mit Chloroform/Methanol 4:1 V. T. eluierte Fraktionen. Aufgetragene Substanzmenge 0,5 mg. Fließgemisch Chloroform/Methanol/Wasser 72:28:4,5 V. T. Darstellung mit Äthanol/Anisaldehyd/Schwefelsäure. Es bedeuten Ch Cholesterin; Cerebr Cerebroside; Col Colamin-Kephalin; Sulf Sulfatide; Sph Sphingomyeline.

die der Summe der in separaten Bestimmungen ermittelten Konzentration der beiden Komponenten entsprach. Die oben angegebenen Bedingungen für die Abspaltung der glycosidisch gebundenen Galactose mit Hilfe von 3n- Schwefelsäure (2 Std. bei 100° C) wurden an Hand eines Dünnschichtchromatogramms überprüft (Abb. 3). Die beiden Cerebrosidfraktionen Kerasin und Nervon bzw. Cerebron und Oxyneron treten in den hydrolysierten Proben nicht mehr in Erscheinung. Daraus ist zu schließen, daß durch die hier angewandte Hydrolyse eine vollständige Spaltung der Cerebroside eingetreten ist. In weiteren Versuchen ließen sich dünn-schichtchromatographisch auch keine Partialspaltprodukte der Cerebroside nachweisen. Es kann gefolgert werden, daß neben der Galactose auch die säureamidartig gebundene Fettsäure abgespalten wurde. Dies bestätigt auch die im Chromatogramm sichtbare Zunahme der freien Fettsäuren.

3. Ergebnis der säulenchromatographischen Gewinnung eines Cerebrosidpräparates als Testsubstanz

Die dünn-schichtchromatographische Überprüfung der Trennung der Gesamtlipide mit Hilfe der Florisil-Säule ergab bei der Elution mit Diäthyläther in den ersten 6 Fraktionen Cholesterin, Phosphatide sowie kleine Mengen an Glyceriden und freien Fettsäuren. Bei der anschließenden Elution mit Chloroform-Methanol 4:1 V. T. ließen sich drei Cerebrosidpräparate gewinnen. Abb. 4 zeigt bei Auftragstelle Nr. 8 Cerebroside mit einer geringen Verunreinigung durch Cholesterin und freie Fettsäuren, bei Nr. 9 ein offenbar reines Cerebrosidpräparat und bei Nr. 10 Cerebroside mit Sulfatiden. Die mittleren Galactoseanteile für diese drei Fraktionen betrugen 17,0; 20,6 und 12,5 %. Bei einer Wiederholung der Trennung mit einer zweiten Säule ergaben sich Galactoseanteile von 17,3; 21,0; 14,8 %. Das Cerebrosidpräparat, das gemäß Nr. 9 des Chromatogramms keine Verunreinigungen zeigte und durch einen Galactosegehalt von 20,6 bzw. 21,0 % gekennzeichnet war, wurde für die weiteren Versuche als Testsubstanz verwendet.

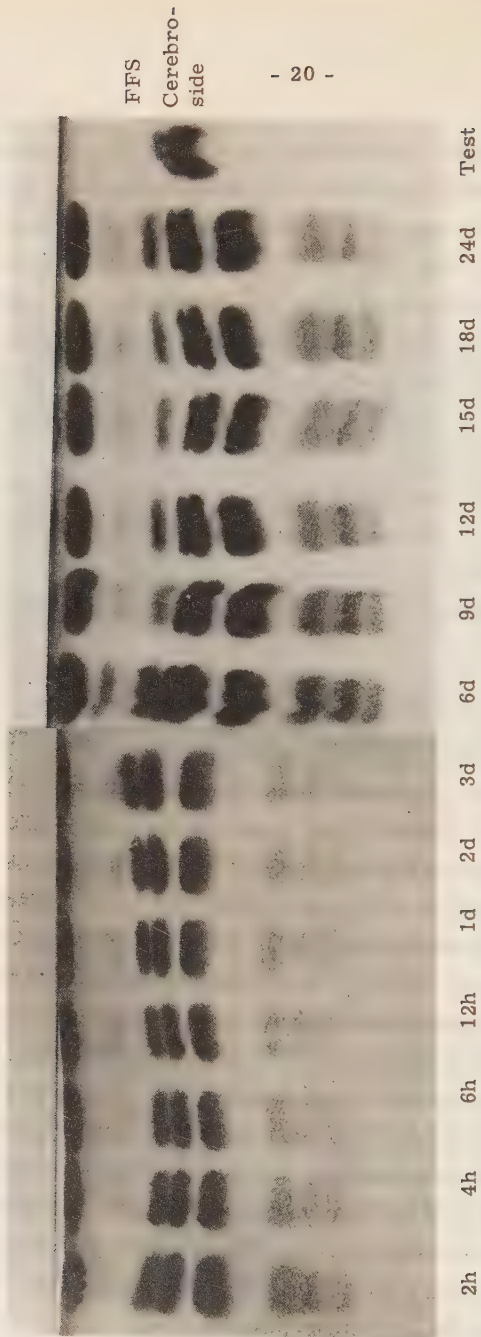


Abb. 5 Dünnschichtchromatogramm der Gesamtlipide der autolisierenden weißen Hirnsubstanz.

Aufgetragene Substanzmenge 0,5 mg. . Fließgemisch Chloroform/Methanol/Wasser 72:28:4, 5 V. T., Darstellung mit Äthanol/Anisaldehyd/Schwefelsäure. Es bedeuten: h autolyierte Stunden; d autolyierte Tage; Test Testsubstanz Cerebroside; Cholest Cholesterin; FFS Freie Fettsäuren; Sph Sphingomyeline.

AUTOLYSEZEIT	2 STD.	4 STD.	12 STD.	24 STD.	2 TAGE	3 TAGE	6 TAGE	9 TAGE	12 TAGE	15 TAGE	18 TAGE	24 TAGE
VORGEGEBENE GESAMTLIPIDMENGE mg	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
BESTIMMTE GALACTOSEMENGE µg	272,0	272,0	271,5	269,7	277,8	285,0	290,2	288,2	288,9	277,5	278,9	280,4
ENTSPRECHENDE CEREBROSIDMENGE mg	1,251	1,251	1,249	1,240	1,278	1,311	1,334	1,326	1,329	1,276	1,282	1,290
CEREBROSIDMENGE IN % DER GESLIPIDE	25,02	25,02	24,98	24,81	25,56	26,22	26,69	26,51	26,58	25,53	25,65	25,80
CEREBROSIDMENGE IN % DER TROCKENSUBSTANZ	16,67	17,02	16,63	16,46	16,96	17,50	17,70	17,30	18,63	16,88	17,63	18,01

Tab. 1 Ergebnisse der quantitativen Cerebrosidbestimmung.

4. Ergebnis der Untersuchung der Autolyseserie.

Abb. 5 zeigt die dünn-schichtchromatographisch aufgetrennten Gesamtlipide, die aus den autolysierten Gewebeproben extrahiert worden waren. Aus der gleichbleibenden Größe und Intensität der den Cerebrosiden zuzuordnenden Flecke ist zu ersehen, daß ein nennenswerter Abbau der Cerebroside während der 24-tägigen Autolyse nicht stattgefunden hat. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Cerebroside sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Ausgangsmenge betrug jeweils 5 mg Gesamtlipide. Darin fanden sich zu Anfang der Serie (2 Std. post mortem) 272,0 μg , am Ende (24 Tge. p. m.) 280,4 μg Galactose, entsprechend Cerebrosidmengen von 1,252 mg bzw. 1,290 mg. Der prozentuale Anteil der Cerebroside in den Gesamtlipiden beträgt am Anfang 25,02 %, am Ende 25,80 %. Bezieht man die Cerebrosidmengen auf die Trockensubstanz, ergeben sich 16,67 % bzw. 18,01 %. Diese relative Zunahme der Cerebroside entspricht der Zunahme der Gesamtlipide (bezogen auf die Trockensubstanz).

Zur Verdeutlichung dieses Sachverhaltes wurden die festgestellten Cerebrosidmengen in Abhängigkeit von der Autolysezeit graphisch dargestellt (Abb. 6). Der nahezu parallele Verlauf der Kurve zur Zeitachse verdeutlicht, daß die Menge der Cerebroside während der Autolyse praktisch konstant bleibt. Eine zweite Kurve (Abb. 7) zeigt die gleichen Ergebnisse in stark vergrößertem Maßstab mit unterdrücktem Nullpunkt. Um eindeutig sagen zu können, daß die hier sichtbaren Schwankungen methodisch bedingt und nicht Ausdruck von Veränderungen während der Autolyse sind, wurde die Fehlerberechnung durchgeführt. Der für diese Methode von SVENNERHOLM (1956) angegebene Standardfehler beträgt 4,2 %⁺. Diese Angabe ermöglicht es, Grenzen festzulegen, zwischen denen die Abweichungen vom Mittelwert der Meßergebnisse als zufallsbedingt angenommen werden müssen. Unter der auf Grund der Dünnschichtchromatographie und der chemischen Analyse aufgestellten vor-

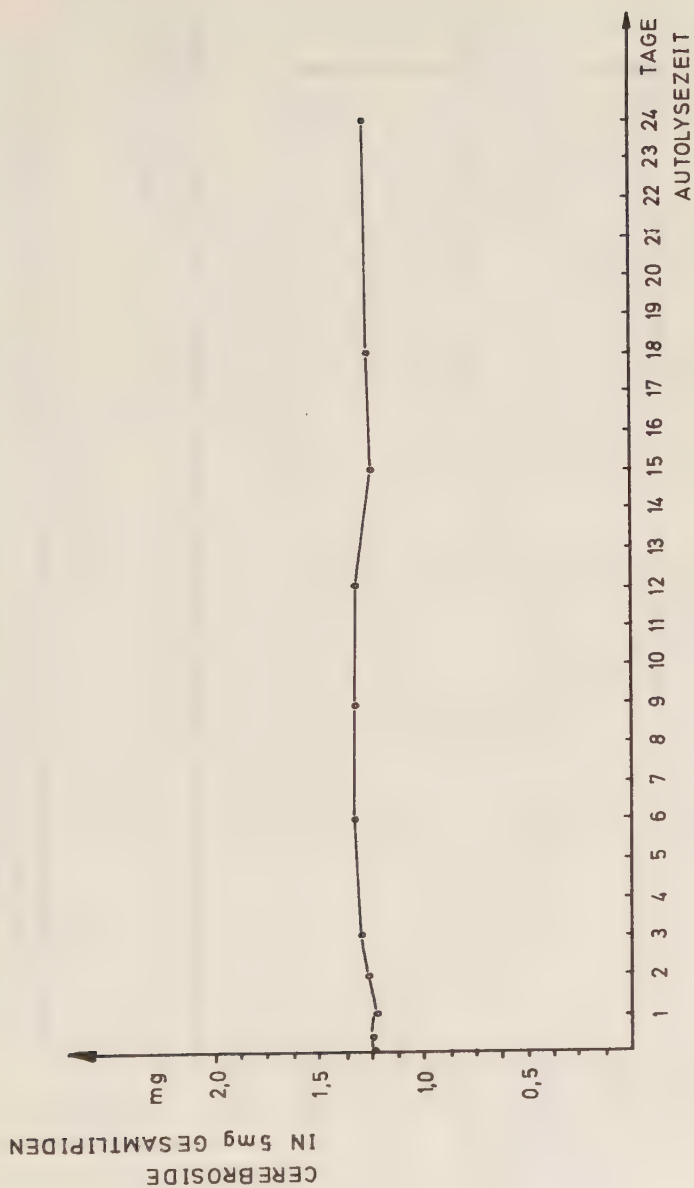


Abb. 6 Abhängigkeit der Cerebrosidkonzentration von der Autolysezeit.

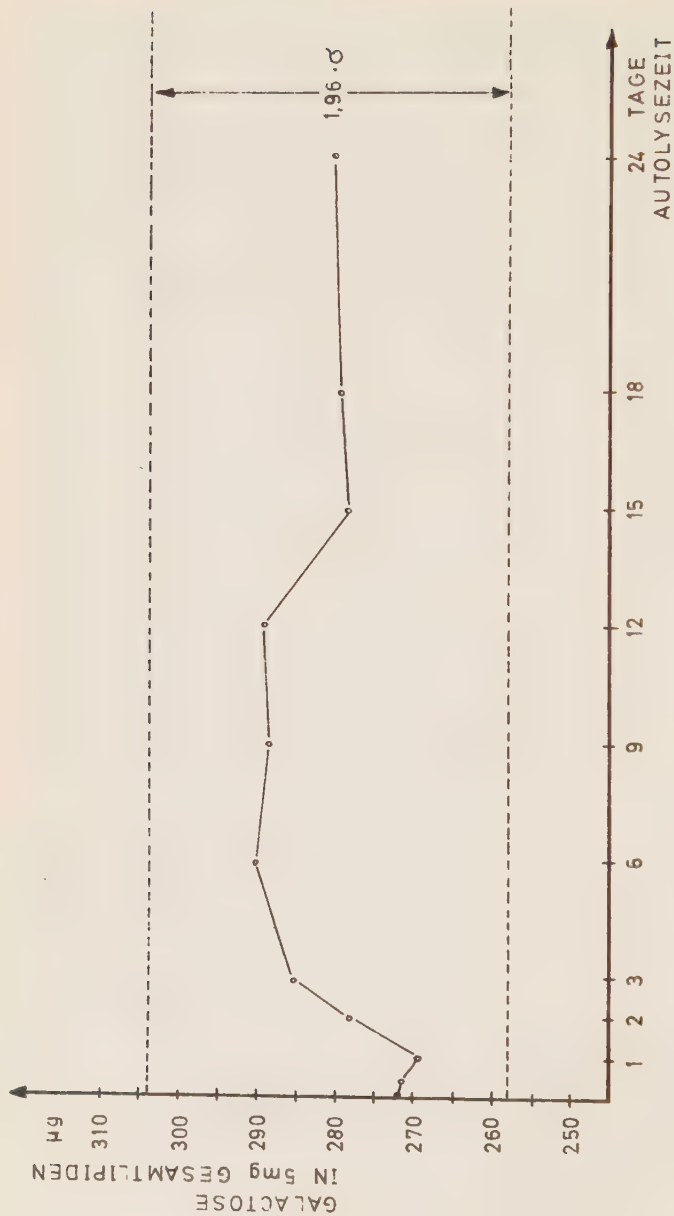


Abb. 7 Abhängigkeit der Galactosekonzentration von der Autolysezeit und Fehlerbreite der Methode.

σ = Standardabweichung

läufigen Hypothese, daß der abspaltbare Zucker konstant bleibt, d. h. die in der Kurve (Abb. 7) auftretenden Schwankungen methodisch bedingt sind, erscheint es sinnvoll, den Mittelwert aller 58 Messungen als Ausgangspunkt der Fehlerberechnung zu nehmen. Er betrug $281,0 \mu\text{g}$. Die Standardabweichung errechnet sich daraus zu $11,8 \mu\text{g}$. Eine Abweichung vom Mittelwert wird dann als bedeutungsvoll angesehen, wenn sie größer als $1,96 \cdot \sigma$ ist (FISHER, 1956). Für diesen Fall wären das $23,1 \mu\text{g}$. Der sich daraus ergebende Bereich zwischen $304,1 \mu\text{g}$ und $257,9 \mu\text{g}$ ist in die Abbildung eingezeichnet. Da die Schwankungen in Abhängigkeit von der Autolysezeit eindeutig innerhalb der durch die Standardabweichung abgesteckten Grenzen liegen, kann man folgern, daß der abspaltbare Zucker während 24-tägiger Autolyse sich mengenmäßig nicht verändert. Der in den vorliegenden Untersuchungen entstehende Standardfehler beträgt $3,4 \%$ und liegt damit in der Nähe des von SVENNERHOLM (1956) angegebenen Fehlers.

Würde während der Autolyse Zucker aus dem Cerebrosidmolekül abgespalten werden, müßte die als Ceramid bezeichnete Verbindung aus Sphingosin und säureamidartig gebundener Fettsäure übrigbleiben. In Ergänzung der quantitativen Bestimmung der Cerebroside wurden deshalb Dünnschichtchromatogramme der Lipidextrakte zur Darstellung möglicher Ceramidbildung angefertigt. Ceramid zeigte sich in keiner der Proben. Dieser Versuch bestätigt, daß bei der Autolyse der weißen Hirnsubstanz keine Spaltung der Cerebroside eintritt.

IV. Diskussion

Zu der in dieser Arbeit getroffenen Auswahl der Methode zur Cerebrosidbestimmung ist folgendes anzumerken.

Nahezu alle bisher veröffentlichten Verfahren zur quantitativen Erfassung der Cerebroside beruhen auf der Bestimmung des durch saure Hydrolyse abgespaltenen Cerebrosidzuckers. Früher wurde vielfach die reduzierende Eigenschaft dieser Kohlenhydrate zu ihrer quantitativen Bestimmung verwertet (KIMMELSTIEL, 1929; FAWAZ u. Mitarbeiter, 1937; BRAND u. SPERRY, 1941; BRANTE, 1949; SOMOGYI, 1937).

Mit der Weiterentwicklung der Untersuchungstechnik ging man dazu über, die Farbstoffbildung der Zucker bei Erhitzen mit einer Mineralsäure und unter Einwirkung eines Phenolderivates zu verwenden (TILLMANN u. PHILIPPI, 1929; SÖRENSEN u. HAUGAARD, 1932; BRÜCKNER, 1941; SVENNERHOLM, 1956). Die Intensität der Farbstoffbildung ist in einem bestimmten Bereich proportional der Zuckerkonzentration. Diese Methode eignet sich zur quantitativen Bestimmung der Cerebroside unter der Voraussetzung, daß andere kohlenhydrathaltige Lipoide, wie Ganglioside, Strandin und verschiedene hexosaminhaltige Lipoide aus dem Gesamtlipidextrakt zuvor entfernt werden. Die Beseitigung der im Gehirnmark ohnehin geringen Konzentration an Gangliosiden und des Strandin wird durch Ausschütteln des FOLCH-Extraktes mit einer schwachen wäßrigen Salzlösung (0,1 % Kochsalz) erreicht (FOLCH, 1951). Hexosamine geben mit Orzin keine Reaktion (SVENNERHOLM, 1956).

Um die angewandte Methode zur quantitativen Bestimmung der Cerebroside zu überprüfen und um Testsubstanzen für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen zur Verfügung zu haben, benötigten wir möglichst reine Cerebroside. Wir stellten nach der oben angegebenen säulenchromatographischen Methode ein geeignetes Präparat

selbst her. RADIN u. Mitarbeiter (1956) fanden für die nach diesem Verfahren hergestellten Cerebroside einen Zuckergehalt von 18,3 %. Zur Abtrennung von Verunreinigungen, insbesondere zur Entfernung der sauren Cerebroside (sulfatveresterte Cerebroside) schlossen diese Autoren eine Passage der "Roh"-Cerebroside durch eine Ionenaustauschersäule an. Auf diese Weise erhielten sie ein Präparat mit einem Galactosegehalt von 19,2 %. Wir verfolgten durch Auffangen jeweils sehr kleiner Mengen des Eluats den genauen Verlauf der Auftrennung der Gesamtlipide mit Hilfe der Florisilsäule. Die dünnschichtchromatographische Kontrolle der einzelnen Fraktionen ergab dann drei Cerebrosidepräparate mit unterschiedlichem Reinheitsgrad. Eines davon enthielt reines Cerebrosid mit einem Galactosegehalt von 20,6 % (zweite Säule: 21,0 %). Wegen der chromatographisch nachgewiesenen Reinheit und des bestimmten Zuckergehaltes, der dem theoretischen sehr nahe kommt, konnten wir auf die Anwendung der Ionenaustauschersäule verzichten.

In den Angaben zur Methodik wurde erwähnt, daß im Autolyseversuch auf die Einhaltung steriler Versuchsbedingungen geachtet wurde. Diese ließen sich jedoch für die ganze Dauer der Autolyse nicht voll aufrechterhalten, da bei den Probeentnahmen sicher Luftkeime in die Autolysekammer gelangten. Fragen der Sterilität autolysierender Gewebeproben unter den oben geschilderten Versuchsbedingungen wurden von MÜTTER (1967) bakterioskopisch geprüft. Es fanden sich nach 8 Tagen Bakterienkolonien so geringen Ausmaßes an der Oberfläche der Gewebeproben, daß mit einem heterolytischen Einfluß auf die Lipide nicht gerechnet zu werden braucht.

Nach dem Ergebnis der vorliegenden Untersuchung bleibt die Menge der Cerebroside während der Autolyse (bis 24 Tage) konstant. Alle Methoden zur Mengenbestimmung der Cerebroside beruhen, wie oben ausgeführt, auf der quantitativen Bestimmung des Zuckergehaltes nach hydrolytischer Spaltung. Die direkte Bestimmung der Cerebroside ist

zur Zeit nicht möglich. Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit auf dem Weg über die Abspaltung des Zuckers festgestellte Veränderungen verbindliche Schlüsse hinsichtlich des Verhaltens der Cerebroside bei der Autolyse zulassen. Eine Spaltung der glycosidischen Bindung durch autolytische Einflüsse unter Bildung von Galactose und Ceramid ist auf Grund der vorliegenden Untersuchung auszuschließen, da die abgespaltene Galactose beim Ausschütteln des Gesamtlipidextraktes in die wäßrige Phase übergegangen wäre. Außerdem trat Ceramid nicht in Erscheinung. Eine möglicherweise auftretende Spaltung der säureamidartigen Bindung unter Bildung von Psychosin (Sphingosin-Galactosid) und freier Fettsäure kann mit dieser Methode nicht ausgeschlossen werden. Eine solche Spaltung ist aber unter den Bedingungen der Autolyse unwahrscheinlich, da die säureamidartige Bindung als sehr stabil gilt. Zu ihrer Spaltung sind relativ hohe Laugenkonzentrationen und langdauerndes Erhitzen erforderlich (KLENK, 1955). Gegen die Abspaltung der Fettsäure aus dem Cerebrosidmolekül spricht noch eine weitere Tatsache. LINDLAR u. LORENZ (1968) fanden nämlich, daß bei der Encephalomalacie C_{24} - Säuren innerhalb der abgespaltenen (freien) Fettsäuren erst erscheinen, wenn im Erweichungsherd eine zellige Reaktion in Form des Auftretens von Makrophagen nachweisbar ist. Ein Abbau der Cerebroside, der nicht an den "Nahtstellen" (säureamidartige oder glycosidische Bindung) erfolgt und der zur Bildung von lipophilen Spaltprodukten führt, die die Galactose noch glycosidisch gebunden enthalten, konnte nicht ausgeschlossen werden. Ein solcher Abbau wäre beispielsweise innerhalb des Fettsäuremoleküls oder Sphingosinmoleküls zu suchen. Es sind uns aber keine Bedingungen bekannt, unter denen im lebenden Organismus oder in vitro eine solche Art der Spaltung stattfindet. Beispielsweise ist auch für die (sicherlich am besten untersuchten) weniger stabilen Phosphatide lediglich der Aufbruch an den sog. Nahtstellen erwiesen. Mit dem Gesagten soll die Möglich-

keit nicht in Abrede gestellt werden, daß nicht nach der Abspaltung der Fettsäuren diese nunmehr weiter oxydiert werden können. Schließlich spricht, wie bereits ausgeführt, das dünnschichtchromatographisch konstante Verhalten der beiden Cerebrosidfraktionen Kerasin mit Nervon und Cerebron mit Oxynervon ebenfalls für die Intaktheit des Cerebrosidmoleküls auch nach mehrwöchiger Autolyse.

Der Prozeß der Autolyse ist bedingt durch den Wegfall der Blutzirkulation und das Fehlen aktiver zellulärer Leistungen. Alle bei der Autolyse auftretenden Ab- und Umbauvorgänge können daher nur spontan (d. h. ohne humorale oder enzymatische Einflüsse) oder durch postmortal infolge der veränderten Stoffwechsellage aktivierte Enzymwirkung eingetreten sein. Die in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesene Stabilität der Cerebroside unter den Bedingungen der Autolyse führt zu dem Schluß, daß Cerebroside offenbar nur vermittels zelliger Reaktion gespalten werden können. Dafür sprechen auch die Befunde von LINDLAR u. LORENZ (1968), die zeigten, daß bei der intra vitam sich abspielenden Hirnerweichung bestimmte Sphingolipoide nur in Gegenwart von Makrophagen ihre säureamidartig gebundene Fettsäurekomponente verlieren.

V. Zusammenfassung

Das Verhalten der Cerebroside der weißen Hirnsubstanz des Menschen während 24-tägiger postmortalen Autolyse wurde untersucht.

Nach Extraktion der Gesamtlipide aus den autolysierten Gewebeproben wurden die Cerebroside qualitativ mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und quantitativ durch Bestimmung des Gehaltes an abspaltbarem Zucker bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß die Cerebroside unter den Bedingungen der Autolyse (bis 24 Tage) unverändert bleiben.

Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung stützt die Annahme, daß Cerebroside nicht azellulär, sondern nur unter bestimmten intravital ablaufenden zellulären Reaktionen gespalten werden können.

VI. Literatur

- BRAND, F. C. and
W. M. SPERRY: The determination of cerebrosides.
J. biol. Chem. 141, 545-553 (1941).
- BRANTE, G. : Studies on lipids in the nervous
system.
Acta physiol. scand. 18, Suppl. 63
1-183 (1949).
- CHARGAFF, E., C. LEVINE
and C. GREEN: Techniques for the demonstration
by chromatography of nitrogenous
lipide constituents, sulfur-con-
taining aminoacids and reducing
sugars.
J. biol. Chem. 175, 67-71 (1948).
- FAWAZ, G., H. LIEB
und M. K. ZACHERL: Zur Kenntnis der Phosphatide
und Cerebroside.
Biochem. Z. 293, 121-132 (1937).
- FISHER, R. : Statistische Methoden für die
Wissenschaft.
Oliver and Boyd, Edinburgh
Tweeddale Court; London 1956.
- FOLCH, J., M. LEES
and G. H. S. STANLEY: A simple method for the isolation
and purification of total lipides
from animal tissues.
J. biol. Chem. 226, 497-509 (1957).
- FOLCH, J., S. ARSOVE
and J. A. MEATH: Isolation of brain strandin, a
new type of large molekular
tissue component.
J. biol. Chem. 191, 819-831 (1951).
- JATZKEWITZ, H. und
E. MEHL: Dünnschicht-Chromatographie der
Gehirnlipide, ihrer Um- und Ab-
bauprodukte.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 320,
251-257 (1960).
- KÄGI-MIESCHER zit.
RANDERATH, K. : Dünnschicht-Chromatographie.
Verlag Chemie, Weinheim Bergstraße
1962.

- KAUFMANN, H. B., Z. MAKUS
und F. DEIKE: Die Dünnschicht-Chromatographie
auf dem Fettgebiet. II Trennung
der Cholesterin- und Fettsäureester.
Fette u. Seifen 63, 235-238 (1961).
- KIMMELSTIEL, P.: Über den Einfluß der Formolfixierung
von Organen auf die Extrahierbarkeit
der Lipoide.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 184,
143-146 (1929).
- KISHIMOTO, Y. and
N. S. RADIN: Isolation and determination methods
for brain cerebroside, hydroxy-
fatty-acids and unsaturated fatty-
acids.
J. Lipid Res. 1, 72-78 (1959).
- KLENK, E.: Über die partiellen Spaltprodukte
von Cerebron.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 153,
74-82 (1926).
- KLENK, E. in Hoppe-Seyler-Thierfelder
Hdb. d. physiol. u. pathol. chem.
Analyse III/2 Springer Verlag,
Berlin 1955.
- LANGE, B.: Kolorimetrische Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim Bergstraße
1952.
- LINDLAR, F. und
R. GÜTTLER: Die Lipoide der weißen Hirnsubstanz
während der Autolyse und bei der
anämischen Erweichung.
Acta neuropath. 6, 349-358 (1966).
- LINDLAR, F. und
F. LORENZ: Über die Abbaufettsäuren in encephalo-
malacischen Herden.
Acta neuropath. 10, 86-90 (1968).
- MANGOLD, H. K. and
N. TUNA: Analysis of tissue lipids by TLC
and GLC.
Fed. Proc. 20, 268-268 (1961).

- MITTENECKER, E. : Planung und statistische Auswertung von Experimenten.
Verlag Franz Deuticke, Wien 1966.
- MÜTTER, M. : Über den chemischen und morphologischen Nachweis von freien Fettsäuren im autolysierenden Pankreas.
Dissertation F. U. Berlin 1967.
- NOLL, A. : Über die quantitative Beziehung des Protagons zum Nervenmark.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 27, 370-397 (1899).
- RADIN, N. S., J. R. BROWN and F. B. LAVIN: The preparative isolation of cerebroside.
J. biol. Chem. 219, 977-983 (1956).
- ROSSITER, R. J. in K. A. C. ELLIOT, I. H. PAGE and J. H. QUASTEL: Neurochemistry, Springfield (III), Thomas 1955.
- SCHNEIDER, H., W. MASSHOFF und G. H. NEUHAUS: Zerebraler Tod und Reanimation.
Wiederbelebung und Organersatz Heft 2, 88-107 (1967).
- SIMON, F. : Zur Kenntnis der Autolyse des Gehirns.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 72, 463-483 (1911).
- SOMOGYI, M. : A reagent for the copper-jodometric determination of very small amounts of sugar.
J. biol. Chem. 117, 771-776 (1937).
- SÖRENSEN, M. und G. HAUGAARD: Über die Anwendbarkeit der Orzinreaktion zur Bestimmung der Art und der Menge von Kohlenhydratgruppen in Eiweißstoffen.
Biochem. Z. 260, 247-277 (1933).

- SPERRY, W. M. : The cleavage of phospholipids by brain tissue.
J. biol. Chem. 170, 675-686 (1947).
- SPERRY, W. H. , F. C. BRAND and W. COPENHAVER: The behaviour of lipides during autolysis of liver and brain.
J. biol. Chem. 144, 297-306 (1942).
- SVENNERHOLM, L. : The quantitative estimation of cerebrosides in nervous tissue.
J. of Neurochem. 1, 42-53 (1956).
- TILLMANS, J. und K. PHILIPPI: Über den Gehalt der wichtigsten Proteine der Nahrungsmittel an Kohlehydrat und über ein kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von stickstofffreiem Zucker in Eiweiß.
Biochem. Z. 215, 36-60 (1929).
- ZÖLLNER, N. und D. EBERHAGEN: Untersuchung und Bestimmung der Lipoide im Blut.
Springer Verlag, Berlin 1965.

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, Herrn Priv. Doz. Dr. F. Lindlar aufrichtig Dank zu sagen für die Anregung zu dieser Arbeit und die fördernde Unterstützung.

Lebenslauf

Am 2. 3. 1944 wurde ich, Carola Leube, als zweite Tochter des Dipl. Ing. Kurt Leube und seiner Ehefrau Anna Leube geb. Kühmstedt in Friedrichroda (Thüringen) geboren. Nach Absolvierung der Grundschulzeit besuchte ich von März 1956 an die Waldoerschule in Berlin-Charlottenburg, ein neusprachliches und mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium. Nach der am 1. 3. 1963 bestandenen Reifeprüfung nahm ich das Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin auf. Ich blieb die gesamte Studienzeit über in Berlin und konnte am 7. 2. 1969 das Studium mit dem Staatsexamen abschließen.

